



REC'D 21 APR 1997

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Le dossier a fait l'objet d'un retrait

Fait à Paris, le 26 MARS 1997

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS Cedex 06
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa

N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☒

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

25 bis, rue de Saint Petersburg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42 94 52 52 Télécopie : (1) 42 93 59 30

Reservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **20 MARS 1996**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9603753**
DEPARTEMENT DE DÉPÔT **20**
DATE DE DÉPÔT **20 MARS 1996**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
B.P. 3011
69392 LYON CEDEX 03

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale
☐ brevet d'invention

Etablissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

ISOLEMENT D'UN MATERIEL NUCLEIQUE

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
MD/MK/B05B2474 72 60 28 90

3 DEMANDEUR (S) N. SIREN 6.7.3.6.2.0.3.9.9 Code APE NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

BIO MERIEUX

Forme juridique

SA

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY L'ETOILE

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire, n° d'inscription)

Dominique GUERRE
CPI 921104

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

D. GIRAUD



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tel (1) 42 94 52 52 - Télécopie (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 03753

TITRE DE L'INVENTION :

ISOLEMENT D'UN MATERIEL NUCLEIQUE

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
B.P. 3011
69392 LYON CEDEX 03
FRANCE

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

CROS Philippe
90 rue du Commandant Charcot
69005 LYON

ELAISSARI Abdelhamid
8 rue Jacques Monod
69007 LYON

SANTORO Lise
1 Place des Quatre Vierges
69110 Ste FOY LES LYONS

MABILAT Claude
408 Chemin Pierre Drevet
69140 RILLIEUX LA PAPE

PICHOT Christian
5 Allée Rolland Garros
69960 CORBAS

RODRIGUE Marc
14E Chemin de Gargantua
69570 DARDILLY

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 18 avril 1996
Dominique GUERRE
CPI 921104

GERMAIN & MAUREAU

La présente invention appartient au domaine de la purification des acides nucléiques, en milieu aqueux.

On connaît selon le document WO-A-95/04140 un procédé pour purifier, en milieu aqueux, des acides nucléiques présents dans un échantillon, selon lequel on met en contact ledit échantillon avec un système particulaire consistant en des billes de silice, en présence d'une substance chaotropique, puis on sépare de la solution aqueuse finale les acides nucléiques fixés sur les billes.

Conformément au document F. MEUNIER et al., Polymers for Advanced Technologies, Vol 6, pp 489-496, (1995), on décrit la préparation d'un polymère dénommé PNIPAM, par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide, (2) N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate, en présence d'un amorceur de polymérisation. Le comportement de ce polymère fonctionnalisé en surface peut le rendre particulièrement adapté à une fixation par covalence, de molécules biologiques.

Selon l'invention on apporte un procédé d'isolement, en phase aqueuse, d'un matériel nucléaire, présent dans un échantillon, comprenant une étape d'adsorption dudit matériel nucléaire, sur un support particulaire, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) un agent de réticulation hydrosoluble et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, ledit polymère présentant une température

critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C, de préférence entre 30 et 40°C,

selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléaire, pour adsorber le matériel sur le support particulaire,

selon une étape (c) dite d'adsorption, pour la mise en contact selon (b), on choisit au moins un et de préférence au moins deux des paramètres suivants pour le milieu réactionnel:

- pH au plus égal à 7,
- force ionique au plus égale à 10^{-2} M,
- température inférieure à la LCST du polymère,

selon une étape (d) dite de séparation, après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare la phase discontinue ayant adsorbé le matériel nucléaire, de la phase continue.

Selon une variante de mise en oeuvre du procédé de l'invention, le polymère particulaire recouvre tout ou partie d'un noyau organique ou inorganique, tel qu'un noyau de polystyrène, à condition que ce noyau ne modifie pas les propriétés d'adsorption du polymère vis-à-vis d'un matériel nucléaire.

Selon une mise en oeuvre particulière et préférentielle de ce procédé, on ajoute dans l'échantillon avant l'étape b), ou dans le milieu réactionnel après l'étape b), et notamment après l'étape c) ou l'étape d), au moins une sonde et/ou une amorce susceptible de s'hybrider spécifiquement sur le matériel nucléaire avant ou après l'étape b).

Dans une autre mise en oeuvre particulière, le matériel nucléaire consiste en une sonde ou une amorce, et selon b) et c) on met en contact le réactif d'adsorption avec ledit matériel nucléaire, pour obtenir un réactif d'hybridation, puis selon b') après éventuellement avoir

observé que l'adsorption a eu lieu, et séparé du milieu réactionnel le réactif d'hybridation, on met en contact ledit réactif d'hybridation avec un milieu contenant au moins un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique, dans des conditions adaptées pour l'hybridation ou l'élongation de l'amorce.

De préférence, pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, pour l'étape (c) d'adsorption, on choisit les deux paramètres suivants :

- 10 - pH au plus égal à 7, et
- température inférieure à la LCST du polymère.

Le polymère particulière est avantageusement obtenu par polymérisation radicalaire, en présence d'un amorceur de polymérisation, cationique ou neutre, et hydrosoluble.

Le premier monomère (1) est de préférence choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides, et plus particulièrement parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

Le ou les seconds monomères, fonctionnels (3) sont de préférence choisis parmi les dérivés acryliques et méthacryliques, le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinyl-pyridine, les dérivés de trialkylammonium et les dérivés de chlorure d'isothiouronium.

Avantageusement l'agent de réticulation (2) est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate, et l'amorceur de polymérisation est le chlorure de 2,2'-azobis amidino-propane (V50).

L'étape (d) de séparation est de préférence effectuée selon une technique choisie parmi la centrifugation, la filtration, la précipitation et la sédimentation.

5 Avant l'étape (d) de séparation on peut éventuellement observer que la réaction d'adsorption s'est produite. A titre d'exemple, on peut utiliser les techniques de HPLC ou d'électrophorèse capillaire.

Pour une étape ultérieure d'analyse, le matériel
10 nucléique adsorbé sur le support particulaire peut être utilisé en l'état, ou après une étape de désorption. Ainsi, après l'étape (c) d'adsorption et après l'étape (d) de séparation :

selon une étape dite de désorption, on dissocie,
15 par désorption, le matériel nucléique par rapport au support particulaire, en faisant varier le paramètre choisi pour l'étape c) d'adsorption comme suit :

- augmentation de la température jusqu'à une température supérieure à la LCST du polymère,
- 20 - augmentation de la force ionique jusqu'à une force ionique supérieure à $10^{-2}M$,
- augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7.

Avantageusement on fait varier, à la fois, la force ionique et le pH.

25 Enfin la présente invention a pour objet l'utilisation d'un polymère particulaire, fonctionnalisé, obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou de dérivé d'acrylamide, (2) un agent de réticulation hydrosoluble et (3) un second
30 monomère, fonctionnel cationique et hydrosoluble, ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) qui est comprise entre 25 et 45°C, pour isoler un matériel nucléique.

Dans une utilisation avantageuse le polymère est
35 obtenu par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide,

(2) N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate.

Avant d'exposer plus en détail l'invention, certains termes employés dans la présente description et
5 dans les revendications sont ci-après définis :

Par isolement d'un matériel nucléaire selon l'invention, on comprend la séparation, la détection de ce matériel, l'enrichissement d'une fraction en matériel nucléaire, selon une méthode d'isolement spécifique ou
10 aspécifique, de manière qualitative et/ou quantitative.

Un matériel nucléaire selon l'invention est un acide nucléaire, un fragment d'acide nucléaire, un mélange d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques, ou une fraction d'acides nucléiques et/ou de
15 fragments d'acides nucléiques. Par acide nucléaire, on entend tout acide nucléaire, sous forme libre ou combinée éventuellement à des protéines, quelle que soit son origine cellulaire, bactérienne, virale ou autre. Il s'agit indifféremment d'un acide désoxyribonucléique ou
20 d'un acide ribonucléique, constitué par un enchaînement de nucléotides naturels dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine, et/ou de nucléotides modifiés dans
25 l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées, telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la
30 bromo-5-désoxyuridine, et telles que des bases modifiées par un traceur détectable directement ou indirectement par des techniques connues de l'homme du métier, à titre d'exemple les bases modifiées par la biotine ; au niveau du sucre, à savoir le remplacement d'au moins un
35 désoxyribose par un polyamide ; et/ou au niveau du groupement phosphate par exemple son remplacement par des

esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl- et aryl-phosphonate et d'alkyl- et aryle-phosphorothioate. L'acide nucléique selon l'invention est totalement ou partiellement monocaténaire et/ou
5 bicaténaire, en particulier il peut consister en un duplex sonde-acide nucléique, sonde-fragment d'acide nucléique, amorce-acide nucléique ou amorce-fragment d'acide nucléique ; le duplex peut être un homoduplex ou un hétéroduplex.

10 L'invention est bien sûr appliquée à l'isolement de fragments d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus, ou oligonucléotides (ODN), de tailles variables.

Le matériel nucléique peut être d'origine naturelle, et/ou obtenu par recombinaison génétique et/ou
15 par synthèse chimique, à titre d'exemple il peut consister en une sonde ou une amorce.

La présente invention est appliquée à l'isolement aspécifique d'une fraction d'acides nucléiques et/ou de fragments d'acides nucléiques, contenue dans un
20 échantillon, mais aussi à l'isolement spécifique d'un acide nucléique ou d'un fragment d'acide nucléique, ou d'un mélange d'acides nucléiques ou de fragments d'acides nucléiques, présents dans un échantillon.

Un échantillon tel qu'on l'entend selon
25 l'invention, comprend tout échantillon susceptible de contenir un matériel nucléique, notamment un échantillon biologique tel que celui obtenu à partir d'un fluide biologique, un échantillon d'origine alimentaire. L'échantillon consiste en tout ou partie d'un échantillon,
30 en particulier il peut consister en un aliquote, une dilution. L'échantillon peut ou non avoir été soumis à un traitement préalable notamment de purification.

La LCST d'un polymère tel que celui qui fait l'objet de la présente invention est notamment définie et
35 mesurée par des techniques décrites dans les documents suivants : Hirosh Inomata et al., Macromolecules 1994, 27,

6459-6464 ; Masahiko Satai et al., Langmuir 1995, 11, 2493-2495 ; Hus Yu 1994, 27, 4554-4560 ; E.I. Tiktopulo et al., Macromolecules 1994, 27, 2879-2882.

Une sonde est un fragment nucléotidique possédant
 5 une spécificité d'hybridation dans des conditions
 déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un
 fragment nucléotidique. Une sonde utilisée dans le cadre
 de la présente invention sera de préférence une sonde de
 capture, sans pour autant exclure de ce cadre les autres
 10 types de sondes.

Par amorce selon l'invention, on entend une sonde
 possédant une spécificité d'hybridation dans des
 conditions déterminées pour l'initiation d'une
 polymérisation enzymatique par exemple dans une technique
 15 d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain
 Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le
 séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou
 analogue.

Par dérivé acrylamide selon l'invention, on entend
 20 un monomère polymérisable répondant à la formule R^0-
 $CH=C(R^1)-CONR^2R^3$, dans laquelle R^0 , R^1 , R^2 et R^3
 représentent un groupe indépendamment choisi parmi
 l'hydrogène, les groupes hydrocarbonés inférieurs,
 linéaires ou ramifiés, aliphatiques ou cycliques, les
 25 groupes hétérocycliques azotés tels que l'imidazole.

L'adsorption de matériel nucléique telle
 qu'entendue selon la présente invention est définie comme
 suit : un matériel nucléique est adsorbé sur un support
 particulière si après un temps de contact entre ledit
 30 matériel et ledit support, au moins un des groupes
 appartenant aux éléments constitutifs du matériel
 nucléique est fixé à la surface du support ; l'adsorption
 résulte d'interactions ioniques et/ou de liaisons
 hydrogène, et éventuellement d'interactions hydrophobes, à
 35 l'exclusion de toute liaison covalente, entre le matériel
 et le support.

Enfin par polymère fonctionnalisé, on entend un polymère présentant au moins une interface portant des groupes fonctionnels susceptibles de générer avec des groupes des éléments constitutifs du matériel nucléique, l'une quelconque des interactions et/ou liaisons impliquées dans le phénomène d'adsorption. De préférence ces groupes fonctionnels sont choisis parmi NH_3^+ , NH_4^+ , NR_3^+ tel que le groupe pyridinium, le groupe isothiouronium.

La présente invention est à présent décrite en référence aux Exemples 1 à 4 et aux Figures 1 à 7 présentées ci-après :

Figure 1 représente la variation de l'interface du polymère en fonction du pH et de la température,

Figure 2 représente l'effet du pH et de la température sur l'adsorption de l'ARN,

Figure 3 représente l'effet du pH à 40°C sur l'adsorption de la BSA,

Figure 4 représente l'effet de la force ionique et de la température sur l'adsorption de l'ARN,

Figure 5 représente l'effet du pH à 20°C sur la désorption de l'ARN,

Figure 6 représente l'effet du pH à 40°C sur la désorption de l'ARN, et

Figure 7 représente l'effet de la force ionique à pH 9,2 et à 20°C sur la désorption de l'ARN.

Comme les exemples suivants l'illustreront, les conditions de pH, de force ionique et/ou de température au cours de l'étape c) d'adsorption sont déterminantes. En effet, comme on peut l'observer sur la Figure 1, en-dessous d'une valeur de pH égale à 7 et de température égale à la LCST du polymère, le polymère présente une chevelure hydrophile, chargée, alors qu'au-dessus d'une valeur de pH égale à 7 et de température égale à la LCST le polymère présente une conformation rétractée hydrophobe et neutre, ce qui entraîne une diminution de l'adsorption

des acides nucléiques et à la fois une adsorption croissante des protéines.

EXEMPLE 1 : Préparation d'un polymère à base de NIPAM

5 Trois techniques de polymérisation ont été utilisées pour la préparation de ce polymère :
1) polymérisation en batch (ou procédé en réacteur fermé);
2) polymérisation en semi-continu et 3) polymérisation sur
semence. Dans chacune de ces techniques, les mêmes
10 réactifs suivants ont été utilisés :

* Premier monomère : N-isopropylacrylamide
(NIPAM) commercialisé par Kodak,

* Réticulant : N,N-méthylène bisacrylamide (MBA)
disponible chez Aldrich,

15 * Amorceur : chlorure de 2,2'-azobis amidino
propane (V50) commercialisé par Wako,

* Sel pour ajuster la force ionique : NaCl
(Prolabo),

* Second monomère, fonctionnel : chlorure de 2-
20 aminoéthyl méthacrylate (AEM) commercialisé par Kodak.

1) Polymérisation en batch :

Le premier monomère (NIPAM), le second monomère,
fonctionnel (AEM) et le réticulant (MBA) sont introduits
ensemble en une seule étape avant que la polymérisation ne
25 soit amorcée par addition de l'amorceur (V50) qui se
décompose sous l'effet de la chaleur en produisant des
radicaux libres. La durée de polymérisation est de 30 mn.

La formulation du polymère obtenu à qui on a
affecté la référence PNIPAM42 est la suivante :

30	volume total(a)	250 ml
	NIPAM	48,51 mmoles
	MBA	3 mmoles
	AEM	0,48 mmoles
	V50	0,30 mmoles
35	Température	70 °C

(a) eau bouillie et dégazée

Les caractéristiques du polymère obtenu sont reportées dans le tableau I suivant:

Tableau I

diamètre ^(a) DDL 20°C	diamètre ^(b) taille DDL 40°C	diamètre ^(c) MET	concentration en AEM ^(d)	LCST ^(e)	CCC ^(f) à 20°C
292 nm	164 nm	129 nm	14,1 µmol/g de polymère	31,5 °C	1.00 mole/l

5

10

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C

15 (c) diamètre mesuré en microscopie électronique

(d) densité de charge exprimée en mmole (amine primaire) / g de polymère

(e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température

20

(f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité.

2) Polymérisation en semi-continu

25

Une partie de second monomère, fonctionnel est introduite dans le réacteur sur une période comprise entre le début de la polymérisation et la fin de la conversion totale de celle-ci. Cet ajout peut être effectué à une vitesse d'injection constante (polymérisation par ajout continu) ou bien suivant un ajout bien contrôlé à des intervalles réguliers (polymérisation en semi-continu). Le but de cette méthode de polymérisation est d'augmenter l'incorporation de second monomère, fonctionnel (chargé) sans augmenter le pourcentage de polymère hydrosoluble dans le milieu réactionnel qui pourrait perturber le déroulement de la polymérisation.

35

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM45 est la suivante :

	volume total ^(a)	250ml
	NIPAM	48,51 mmoles
5	MBA	3 mmoles
	AEM	0,48 mmoles
	V50	0,30 mmoles
	Température	70°C
	ajouts	entre 3 et 6 min

10 (a) eau bouillie et dégazée

Les caractéristique du polymère PNIPAM45 obtenu sont reportées dans le tableau II suivant :

Tableau II

15	diamètre ^(a) DDL 20°C	diamètre ^(b) wille DDL 40°C	diamètre ^(c) MET	concentration en AEM ^(d)	LCST ^(e)	CCC ^(f) à 20°C
	823 nm	530 nm	327 nm	10,0 µmol/g de polymère	32 °C	1.00 mole/l

20 (a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C

(c) diamètre mesuré en microscopie électronique.

25 (d) densité de charge exprimée en mmole (amine primaire) / g de polymère

(e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température

30 (f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité.

3) Polymérisation sur semence

35 Cette technique consiste à introduire le second monomère, fonctionnel dans un milieu réactionnel contenant un polymère préalablement préparé et parfaitement

caractérisé. Le second monomère, fonctionnel peut être additionné seul ou en mélange avec le ou les monomère(s) ou les comonomères, en une étape ou en semi-continu.

La formulation du polymère obtenu à qui on a affecté la référence PNIPAM94 est la suivante :

Un volume de 40 ml de semence à un taux de solide de 4,5 % est utilisé. Les réactifs ont été ajoutés dilués dans un volume de 5 ml d'eau. Les pourcentage molaires de NIPAM, de MBA et de V50 ajoutés dans la deuxième étape sont identiques à ceux de la semence (cf 1)). En revanche, la concentration en second monomère, fonctionnel est contrôlée (augmentée ou diminuée suivant la densité de charge voulue) ; dans ce cas 10 % (mole) de AEM sont ajoutés par rapport au premier monomère NIPAM.

Les caractéristiques du polymère PNIPAM94, obtenu après réensemencement à partir de la semence inscrite sous la référence PNIPAM93 synthétisée suivant le mode opératoire décrit dans 1), sont reportées dans le tableau III suivant :

Tableau III

diamètre ^(a) DDL 20°C	diamètre ^(b) taille DDL 40°C	diamètre ^(c) MET	concentration en AEM ^(d)	LCST ^(e)	CCC ^(f) à 20°C
504 nm	290 nm	176 nm	22.4 µmol/g de polymère	32 °C	1.10 mole/l

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C

(c) diamètre mesuré en Microscopie électronique

(d) densité de charge exprimée en mmole(amine primaire)/ g de polymère

(e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température

(f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C
5 déterminée par mesure de turbidité en fonction de la salinité.

En fin de polymérisation les particules sont collectées par simple centrifugation et redispersées dans l'eau ou dans un milieu désiré.

10 Les caractéristiques du polymère obtenu selon l'une quelconque des techniques 1) à 3) sont les suivantes :

- Densité de charge (cationique) entre 5 et 150 mmol/g de polymère

15 - Intervalle de la taille des particules comprise entre 0,05 et 2 μ m, diamètre des particules mesuré en diffusion dynamique de la lumière à 20°C

- Intervalle de la concentration critique de coagulation (CCC) entre 0,001 et 1,5 mole/l NaCl à 20°C et
20 entre 0,01 et 0,9 mole/l NaCl à 40°C.

EXEMPLE 2: Adsorption d'ARN ou de BSA (sérumalbumine bovine) sur des particules de polymère PNIPAM tel que préparé selon l'Exemple 1

Le protocole suivant constitue le mode opératoire
25 général des réactions d'adsorption:

Le mélange réactionnel est constitué de 10 μ l d'ARN (4 mg/ml) ou de 50 μ l de BSA (5 mg/ml), et de 50 μ l de particules NIPAM (45g/l). Le volume final de un millilitre est obtenu par adjonction de tampon phosphate
30 (10 mM pH 4,6 ou 9,2) et NaCl (5M) afin d'atteindre le pH et la force ionique désirée.

L'entité moléculaire (ARN ou BSA) est adsorbée sur les particules durant 2 heures (à 20 ou 40°C) avec des conditions prédéterminées (pH, force ionique): le mélange
35 est centrifugé 20 minutes à 14 000 tours par minute. Le surnageant est récupéré, filtré sur filtre Millipore

Millex-GV13 ($0,22 \mu\text{m}$) afin d'éliminer les particules de polymère en suspension. La quantité de l'entité biologique fixée sur le support polymère est déterminée par une simple différence entre la quantité initialement
5 introduite et la quantité restante et libre (dosée dans le surnageant): cette quantité est à chaque fois exprimée en milligramme de molécules biologiques par milligramme de polymère (Ns). Les concentrations d'ARN et de BSA sont estimées par spectrophotométrie UV (Kontron Instrument) à
10 une longueur d'onde de 260 nm ou 280 nm respectivement.

Les essais ont été réalisés avec de l'ARN 16S et 23S ribosomal de *E. coli* (Boehringer) et de la BSA (Sigma référence A0281) utilisés sans purification préalable.

Les particules utilisées sont des particules
15 thermosensibles de PNIPAM94. Ces particules sont très hydrophiles à température ambiante et hydrophobes à une température supérieure à la LCST (32°C). Elles ont été synthétisées comme décrit dans l'exemple 1.

Des tampons phosphate acide (KH_2PO_4 10 mM pH 4,6)
20 et basique (K_2HPO_4 10 mM pH 9,2) ont été utilisés pour les réactions d'adsorption et pour contrôler le pH des réactions.

NaCl (5M) a été utilisé pour contrôler la force ionique des réactions.

25 L'eau utilisée dans l'ensemble des réactions a été purifiée sur le système de purification Millipore-Milli Q.

Les incubations ont été réalisées sur un thermomixer (Eppendorf 5436).

Toutes les réactions ont été réalisées dans des
30 tubes Eppendorf de 1,5 ml.

1) Etude de l'influence du pH et de la température sur l'adsorption

Conformément à la Figure 2, On observe une meilleure fixation de l'ARN à pH acide qu'à pH basique. A
35 pH acide les particules sont largement chargées positivement et les acides nucléiques chargés négativement

se fixent sur les particules via des forces électrostatiques. La fixation est plus importante à 20°C qu'à 40°C. Les résultats à 40°C sont dus à une diminution de l'adsorption par diminution de la surface du polymère induite par la rétraction de la chevelure. Cette modification interfaciale peut entraîner une inaccessibilité de la charge cationique.

Conformément à la Figure 3, à 40 °C l'adsorption de la BSA sur les particules est possible sans aucune influence notable du pH via des interactions hydrophobes. A 20°C on n'observe aucune fixation de BSA en raison du caractère hydrophile des particules à cette température.

2) Etude de l'influence de la force ionique et de la température sur l'adsorption

Conformément à la Figure 4, les forces électrostatiques attractives entre les ARN chargés négativement et la surface de polymère chargée positivement diminuent avec l'augmentation de la force ionique avec comme conséquence une diminution de la fixation de l'ARN. Il faut noter que l'augmentation de la force ionique peut influencer aussi sur la retraction de la chevelure du polymère qui est de nature polyélectrolytique.

Dans les mêmes conditions expérimentales, il a été vérifié que l'augmentation de la force ionique ne favorise pas la fixation de la BSA sur les particules.

En conclusion, les acides nucléiques sont préférentiellement adsorbés sur les particules à température inférieure à la LCST (20°C), à faible force ionique et pH acide. Dans ces conditions l'adsorption des protéines (telle la BSA) n'est pas favorisée. Les acides nucléiques peuvent être ainsi spécifiquement adsorbés.

EXEMPLE 3: DESORPTION D'ARN ADSORBE SUR des particules de polymère PNIPAM

Les réactifs utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans l'exemple 2.

Le protocole suivant constitue le mode opératoire général des réactions de désorption:

Après une étape d'adsorption réalisée comme dans l'exemple 2, la réaction de désorption est effectuée après
5 l'étape de centrifugation à 14000 tours par minute. le surnageant est éliminé et remplacé par un millilitre de tampon de désorption (phosphate (10mM pH 4,6 ou 9,2) et NaCl (5M)) afin d'atteindre le pH et la force ionique désirée. L'échantillon est désorbé des particules durant 2
10 heures (à 20 ou 40°C) ; le mélange est centrifugé 20 minutes à 14000 tours par minute. Le surnageant est récupéré, filtré sur filtre Millipore Millex-GV13 (0,22 μ m) afin d'éliminer les particules de polymère en suspension. La quantité de Ns (exemple 2) désorbée est
15 déterminée par spectrophotométrie UV (Kontron Instrument) à une longueur d'onde de 260 nm. L'acide nucléique récupéré est disponible pour d'autres analyses

1) Etude de l'influence du pH et de la température sur la quantité d'ARN désorbée

20 Conformément à la Figure 5, la désorption des acides nucléiques à pH basique est plus importante en raison de la perte de charge sur le polymère; à pH acide la quantité desorbée est beaucoup plus faible car les particules sont fortement chargées positivement dans ce
25 domaine de pH.

Conformément à la Figure 6, comme précédemment la désorption des acides nucléiques est favorisée à pH basique. Elle est également favorisée par l'augmentation de la température. Pour une température supérieure à la
30 LCST (32°C) les particules se rétractent et le nombre de charges positives accessibles diminue.

D'une façon générale les paramètres pH et température seront déterminés conjointement.

2) Etude de l'influence de la force ionique
35 sur la quantité d'ARN désorbée

Conformément à la Figure 6, au fur et à mesure de l'augmentation de la force ionique, les interactions électrostatiques attractives entre les ARN et la surface du polymère diminuent, l'énergie d'adsorption est réduite ce qui favorise la désorption des acides nucléiques. Ce phénomène est amplifié par la modification de l'équilibre d'adsorption.

En conclusion, les acides nucléiques sont préférentiellement désorbés des particules à 40°C, à forte force ionique et pH basique.

De plus, la propriété de rétraction des particules à 40°C (température supérieure à la LCST) peut être exploitée pour concentrer la solution d'acide nucléique désorbée. Après adsorption, le volume de reprise des particules dans lequel l'adsorption sera réalisée peut être réduit.

EXEMPLE 4: ADSORPTION ET DESORPTION D'ADN A PARTIR D'UNE SOLUTION MIXTE D'ADN ET DE BSA, EN UTILISANT LES PARTICULES DE NIPAM

Une solution d'ADN de *Staphylococcus epidermidis* extraite et purifiée au laboratoire à partir de colonies isolées de bactéries, et de protocoles d'extraction basé sur l'utilisation de solvants phénol / chloroforme / alcool isopropylique (D. TRECO dans Short Protocols in Molecular Biology Second Edition Ed : Harvard Medical School, 1992, pp 2-4/2-7).

Une solution mère de BSA (serum bovine albumine) (Intergen 3210-01) 10 % (p/v) en eau milliQ est utilisée.

Protocole NIPAM: une solution d'ADN (1010 copies /ml) est adsorbé et désorbé comme décrit dans les exemples 2 et 3,, à l'exception du volume de récupération de l'acide nucléique lors de l'étape de désorption (50 µl au lieu de 1 ml). 10 µl du surnageant de désorption sont amplifiés par la technique PCR décrite ci-dessous.

Protocole PCR: la technique de PCR suivie est celle décrite par Goodman dans PCR Strategies Ed : Innis,

Gelfand et Sninsky Academic Press 1995, pp17-31. Deux amorces d'amplification ont été utilisées; elles présentent les séquences suivantes:

Amorce 1 : ATCTTGACATCCTCTGACC

5 Amorce 2 : TCGACGGCTAGCTCCAAAT

Les cycles de température suivants ont été utilisés lors du protocole d'amplification:

	1 fois	3 minutes	94°C
		2 minutes	65°C
10	35 fois	1 minute	72°C
		1 minute	94°C
		2 minutes	65°C
	1 fois	5 minutes	72°C

10 µl de produit d'amplification sont traités et
 15 déposés sur gel d'agarose 0.8% (FMC 50003) préalablement coloré au bromure d'éthidium. Après migration électrophorétique 45 minutes à 180V, les bandes d'acides nucléiques sur gel sont visualisées sous rayonnement ultra-violet (D; VOYTAS dans Short Protocols in Molecular
 20 Biology Second Edition Ed : Harvard Medical School, 1992, pp2-13/2-14).

1) Adsorption et désorption d'ADN sur les particules et détection après technique PCR, de l'ADN désorbé

25 Une solution d'ADN (10^{10} copies /ml) a été adsorbée sur les particules à 20°C, pH 4,6 pendant deux heures puis désorbée 15 minutes à 41°C, pH 8,3, force ionique 0,05 M comme décrit dans les exemples 2 et 3. Après l'étape de désorption, le matériel récupéré dans le
 30 surnageant a été amplifié par PCR et analysé sur gel d'agarose 0,8 %. Du matériel ADN est détecté sur gel à la taille attendue (490 pb). La quantité d'ADN détectée après PCR est au moins équivalente à celle détectée après amplification par PCR de 10^6 copies /ml sans contact
 35 préalable avec les particules.

Les particules de NIPAM94 peuvent être également utilisées pour adsorber et désorber de l'ADN. L'ADN désorbé peut être utilisé dans une réaction d'amplification de type PCR. Les particules de NIPAM ne
5 semblent pas relarguer de produits susceptibles d'inhiber une réaction d'amplification de type PCR.

2) Adsorption d'ADN à partir d'une solution mixte ADN et BSA, et détection après technique PCR, de l'ADN désorbé

10 Une solution d'ADN (10^{10} copies/ml) en présence de 10 % (p/v) de BSA est adsorbée et désorbée comme décrit dans l'exemple 4 1). Les mêmes techniques d'amplification et de détection sont utilisées. Du matériel ADN est détecté sur gel à la taille attendue (490 pb). Une même
15 quantité d'ADN est détectée sur gel en présence ou en absence de BSA.

Les particules de NIPAM94 permettent d'adsorber et désorber de l'ADN provenant d'une solution mixte ADN - 10% BSA. La présence de la BSA dans la solution initiale ne
20 semble pas perturber l'adsorption de l'ADN sur les particules.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'isolement, en phase aqueuse, d'un matériel nucléaire, présent dans un échantillon, 5 comprenant une étape d'adsorption dudit matériel nucléaire, sur un support particulaire, caractérisé en ce que :

selon une étape (a) dite d'obtention du réactif d'adsorption, on dispose d'un réactif d'adsorption 10 comprenant un sol constitué par une phase continue aqueuse et une phase discontinue du support particulaire qui comprend un polymère particulaire, fonctionnalisé, ledit polymère étant obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé 15 d'acrylamide, (2) un agent de réticulation hydrosoluble et (3) au moins un second monomère, fonctionnel, cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée qui est comprise entre 25 et 45°C,

20 selon une étape (b) dite de mise en contact, on met en contact le réactif d'adsorption avec l'échantillon contenant le matériel nucléaire, pour adsorber le matériel sur le support particulaire,

selon une étape (c) dite d'adsorption, pour la 25 mise en contact selon (b), on choisit au moins un des paramètres suivants pour le milieu réactionnel:

- pH au plus égal à 7,
- force ionique au plus égale à 10^{-2} M,
- température inférieure à la LCST du polymère,

30 selon une étape (d) dite de séparation, après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, on sépare la phase discontinue ayant adsorbé le matériel nucléaire, de la phase continue,

2. Procédé selon la revendication 1, 35 caractérisé en ce que :

selon l'étape (c) d'adsorption, pour la mise en contact selon (b), on choisit au moins deux desdits paramètres.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on ajoute dans l'échantillon avant l'étape (b), ou dans le milieu réactionnel après l'étape (b) et notamment après l'étape (c) ou l'étape (d) au moins une sonde et/ou une amorce susceptible de s'hybrider spécifiquement sur le matériel nucléique.

10 4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que :

selon b) et c) on met en contact le réactif d'adsorption avec le matériel nucléique consistant en une sonde ou une amorce, pour obtenir un réactif d'hybridation,

15 selon b') après éventuellement avoir observé que l'adsorption a eu lieu, et séparé du milieu réactionnel le réactif d'hybridation, on met en contact ledit réactif d'hybridation avec un milieu contenant au moins un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique, dans des conditions adaptées pour l'hybridation ou l'élongation de l'amorce.

5. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que pour l'étape (c) d'adsorption, on choisit les deux paramètres suivants :

- pH au plus égal à 7,
- température inférieure à la LCST du polymère,

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la LCST du polymère est comprise entre 30 et 40°C.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le premier monomère (1) est choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides.

35 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le premier monomère (1) est choisi

parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le ou les seconds monomères, fonctionnels (3) sont choisis parmi les dérivés acryliques et méthacryliques, le chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinylpyridine, les dérivés de trialkylammonium et les dérivés de chlorure d'isothiouronium.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'agent de réticulation (2) est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'amorceur de polymérisation est choisi parmi les amorceurs neutres et cationiques, hydrosolubles, tel que le chlorure de 2,2'-azobis amidino-propane (V50).

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, après l'étape (d) de séparation, une étape dite de désorption, selon laquelle on dissocie, par désorption, le matériel nucléique par rapport au support particulaire, en faisant varier au moins un des paramètres choisis pour l'étape c) d'adsorption.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que, pour l'étape de désorption, on fait varier au moins deux paramètres comme suit :

- augmentation de la force ionique jusqu'à une force ionique supérieure à $10^{-2}M$,
- augmentation du pH jusqu'à un pH supérieur à 7.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'étape (d) de séparation est effectuée par une technique choisie parmi la centrifugation, la filtration, la précipitation, et la sédimentation.

15. Utilisation d'un polymère particulaire, fonctionnalisé, obtenu par polymérisation de (1) un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou de dérivé d'acrylamide, (2) un agent de réticulation hydrosoluble et (3) au moins un second monomère, fonctionnel cationique et hydrosoluble, et ledit polymère présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) qui est comprise entre 25 et 45°C, pour isoler un matériel nucléaire.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que le polymère PNIPAM est obtenu par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide, (2) N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate.

FIG 1

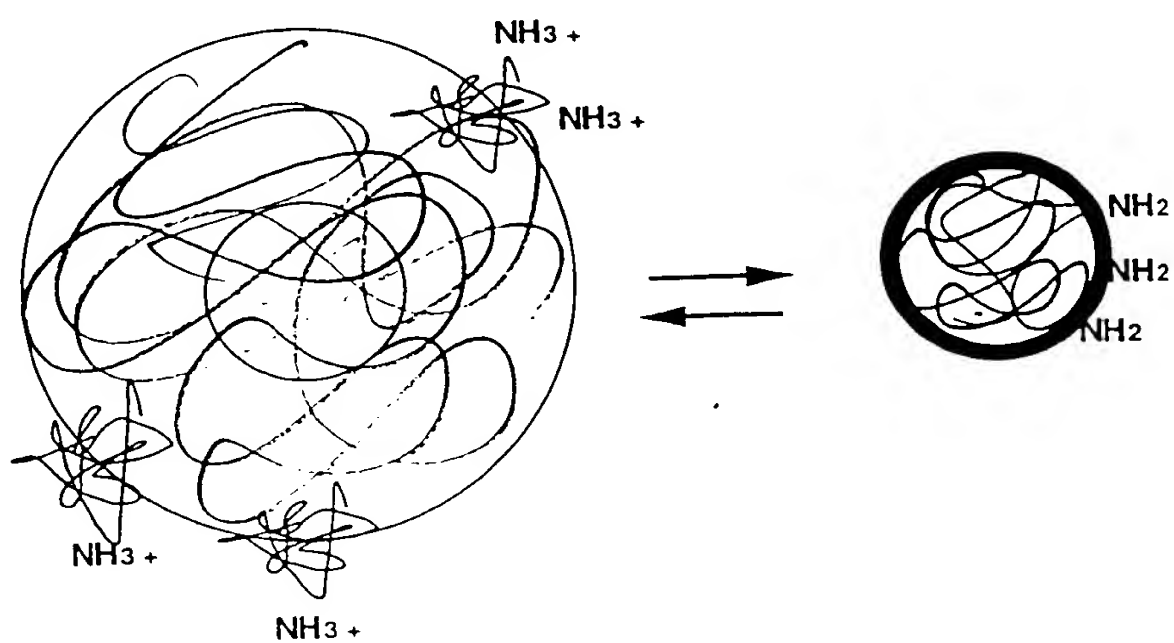


FIG 2

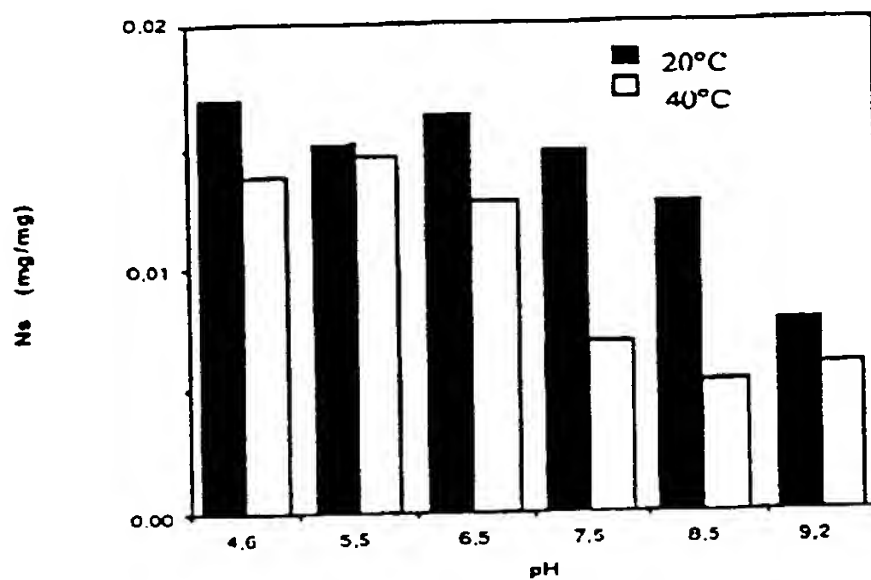


FIG 3

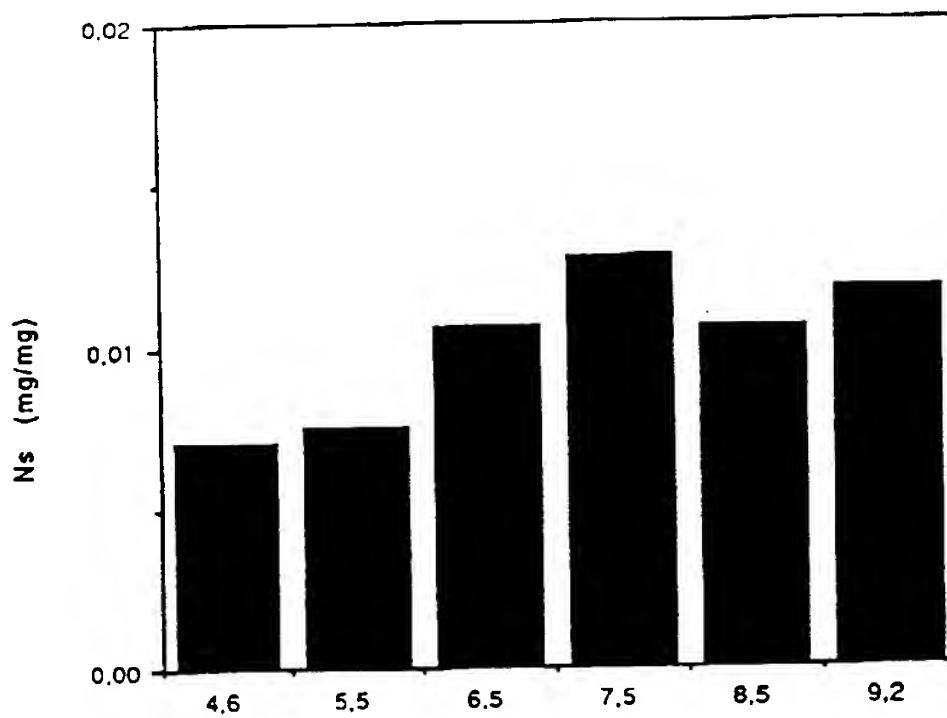


FIG 4

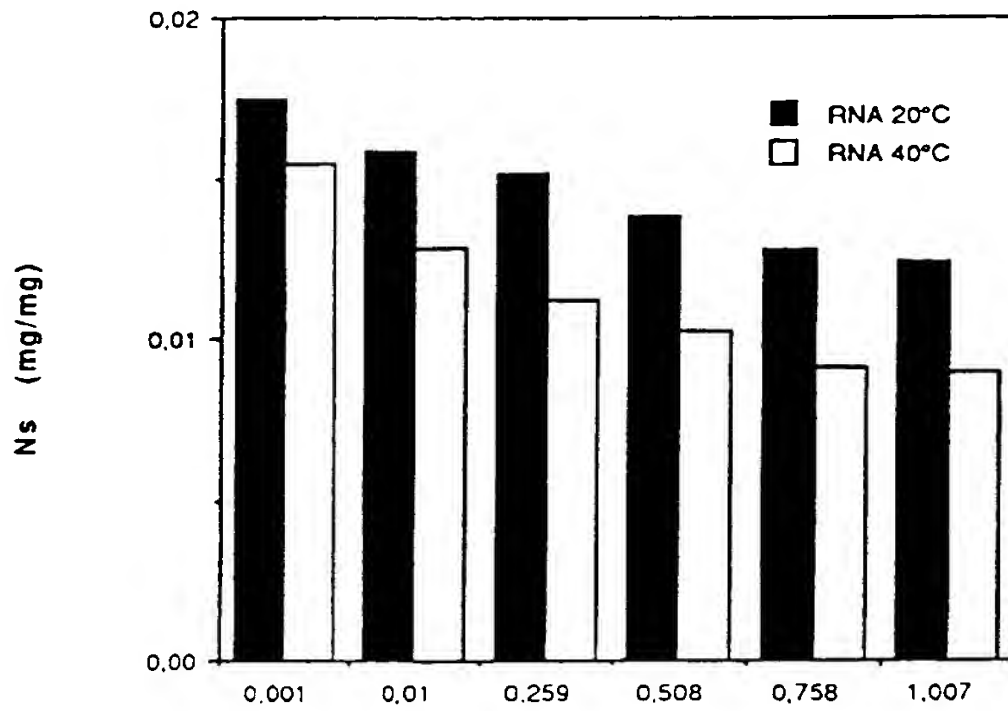


FIG 5

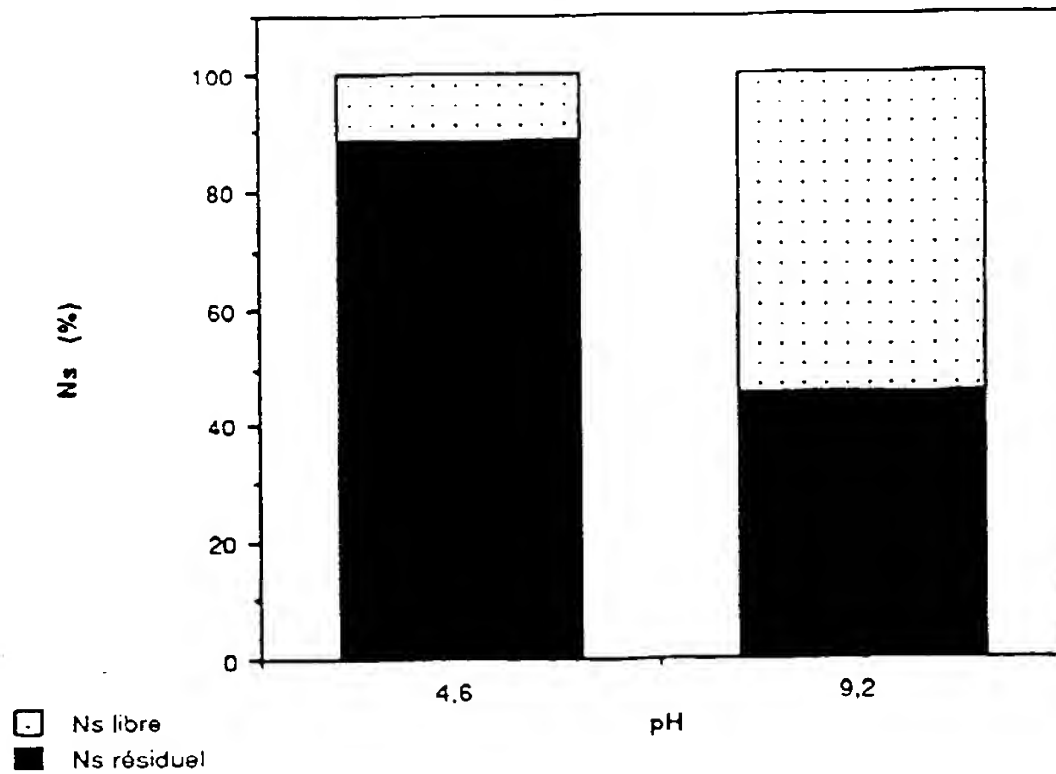


FIG 6

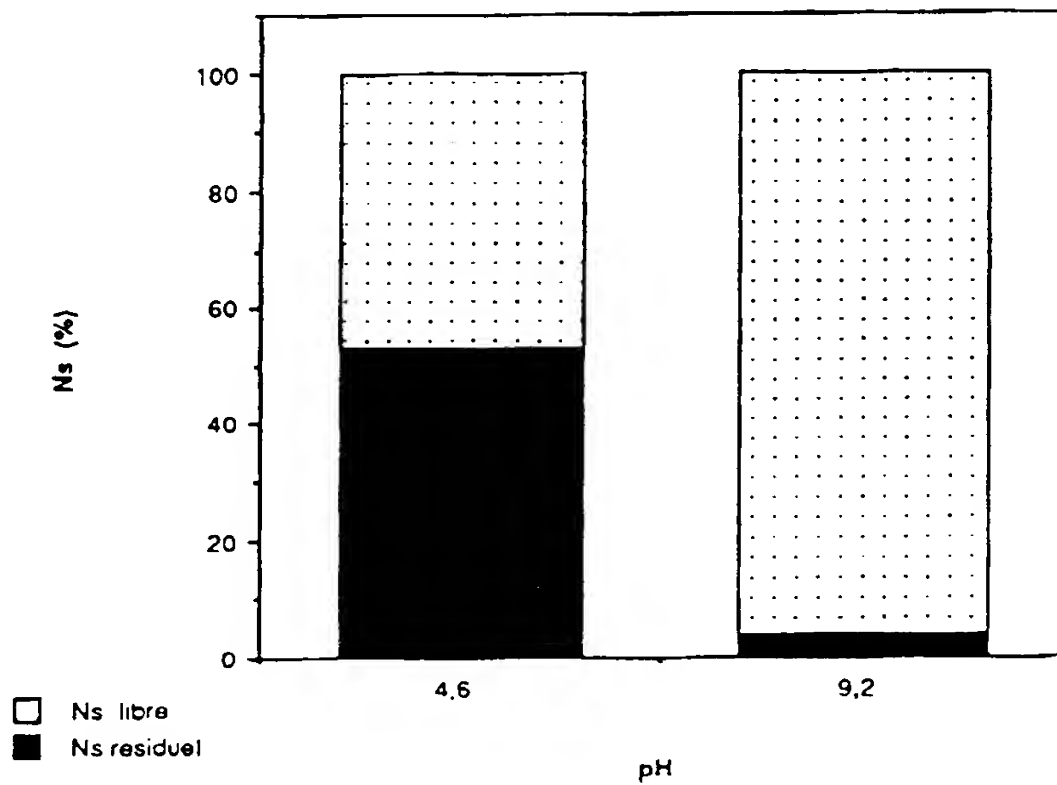


FIG 7

